

Title	Alternative Splicing of Staufe2 Creates the Nuclear Export Signal for CRM1(Exportin 1)
Author(s)	三木, 貴司
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46301
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について ご参照 ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名 三 木 貴 司

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 20058 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 18 年 3 月 24 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第1項該当

医学系研究科情報伝達医学専攻

学 位 論 文 名 Alternative Splicing of Staufen2 Creates the Nuclear Export Signal for CRM1 (Exportin 1)
(Staufen2 の選択的スプライシングは CRM1 (Exportin 1) に対する核外移行シグナルを生成する)

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 米田 悦啓

(副査)

教 授 遠山 正彌 教 授 内山 安男

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

神経細胞における樹状突起への mRNA 局在化は、神経活動に応じて時間的・空間的に制御された蛋白質合成を可能にしている。樹状突起への mRNA 輸送担体として、RNA granule と呼ばれる RNA-蛋白質複合体がある。種々の mRNA、RNA 結合蛋白質、リボソーム、翻訳因子、モーター蛋白質などが RNA granule を構成していることが報告されているが、それらの構成因子がいかなる過程を経て RNA granule に組み入るのか、つまり RNA granule の形成メカニズムは全く不明である。

Staufen2 (Stau2) は RNA granule 構成因子の 1 つである RNA 結合蛋白質であり、樹状突起への mRNA 輸送に寄与している。しかし、Stau2 により樹状突起に輸送される mRNA が、核内で転写により作られた後、どの段階で Stau2 と複合体を形成し、RNA granule に組み込まれるのかは不明である。1 つのモデルとして、Stau2 が核内で mRNA と結合した後、核外輸送され、細胞質で RNA granule に組み込まれるという可能性が考えられる。このモデルの前提として、Stau2 は細胞質と核の間をシャトルしている必要がある。本研究では、Stau2 が核-細胞質間をシャトルしているかどうかを確かめ、さらにそのメカニズムを明らかにすることを目的とした。

〔 方法ならびに成績 〕

Stau2 は分子内に 4 つの二本鎖 RNA 結合ドメイン (RBD) を有する蛋白質であり、主に細胞質に局在する。Stau2 の細胞内局在に寄与するドメインを決定するため、様々な deletion mutant を作製し、GFP 融合蛋白質として HeLa 細胞に発現させ、それらの局在を蛍光顕微鏡観察した。その結果、RBD3 と RBD4 の間のドメインが Stau2 の核内移行を、RBD3 が Stau2 の核外移行を担っていることが示された。これにより、Stau2 が核-細胞質間をシャトルしていることが明らかとなった。

選択的スプライシングにより生成される Stau2 の 4 つの isoform の 1 つ Stau2⁶² の RBD3 に point mutation を導入し (Stau2⁶²RBD3*) RNA 結合活性を失わせると、Stau2⁶²RBD3* は核に集積した。野生型 Stau2⁶² を発現させた HeLa 細胞を、蛋白質核外輸送因子 CRM1 の阻害剤 leptomycin B (LMB) で処理しても Stau2⁶² は核に集積しな

かったことから、RBD3 に依存した Stau2⁶² の核外輸送は CRM1 以外の核外輸送因子に担われていることが示唆された。一方、別の isoform である Stau2⁵⁹ の RBD3 に point mutation を導入したところ、Stau2⁵⁹RBD3* は核に集積せず細胞質に局在した。Stau2⁵⁹RBD3* を発現させた HeLa 細胞を LMB で処理すると、Stau2⁵⁹RBD3* は核に集積した。野生型 Stau2⁵⁹ は LMB 処理により核集積しなかった。さらに RNAi による CRM1 のノックダウンでも同様の結果が確かめられた。これらの結果から、Stau2⁵⁹ には 2 つの核外輸送経路、つまり RBD3 を介した経路と CRM1 に依存した経路が存在することが示された。

Stau2⁶² と Stau2⁵⁹ の構造は N 末のみが異なるため、Stau2⁵⁹ の N 末端に CRM1 により認識される核外移行シグナル (NES) が存在することが予想された。Stau2⁶² と Stau2⁵⁹ の N 末端を GFP 融合蛋白質として HeLa 細胞に発現させたところ、Stau2⁵⁹ の N 末端のみが細胞質に局在し、さらにこれは LMB 処理により阻害された。CRM1 により認識される NES の多くはロイシンなどの疎水性アミノ酸を多く含んだ 10 残基前後の配列である。Stau2⁵⁹ の N 末端付近の配列 INQMFSVQLSL はこの特徴に合致した。そこで INQMFSVQLSL を GFP 融合蛋白質として HeLa 細胞に発現させたところ、GFP-INQMFSVQLSL は細胞質に局在し、さらにこれは LMB 処理により阻害された。この結果から、配列 INQMFSVQLSL が Stau2⁵⁹ の CRM1 に対する NES として同定された。

以上より、HeLa 細胞において Stau2 は核-細胞質間をシャトルしており、Stau2⁶² は RBD3 を介して、Stau2⁵⁹ は RBD3 を介する経路と CRM1 に依存した経路の 2 つの経路で核外輸送されることが示された。さらに、初代培養ラット神経細胞においても Stau2 が同様の挙動を示すことが確認された。

[総括]

本研究では、神経細胞における樹状突起への mRNA 輸送担体 RNA granule の構成因子である RNA 結合蛋白質 Stau2 の細胞内挙動が解析された。その結果、Stau2 が核-細胞質間をシャトルしていることが示された。現時点では Stau2 が核内で mRNA と結合しているかどうかは不明であるが、この結果から、Stau2 が核内で mRNA と結合した後、核外輸送され、RNA granule に組み込まれる可能性が示唆された。また、本研究において Stau2 の isoform 間の機能差が初めて明らかとなった。つまり、Stau2⁶² が RBD3 を介して核外輸送されているのに対し、Stau2⁵⁹ は RBD3 を介した経路と CRM1 による経路の 2 つの経路で核外輸送されることが示された。

論文審査の結果の要旨

本研究において、申請者は神経細胞における樹状突起への mRNA 輸送担体 RNA granule の構成因子 Stau2 (Stau2) に着目し、Stau2 の核-細胞質間挙動を解析した。申請者は Stau2 deletion mutant の細胞内局在解析により、Stau2 の核内移行ドメインおよび核外移行ドメインを同定し、Stau2 が核-細胞質間をシャトルしていることを見出した。さらに、isoform の一つ Stau2⁶² が二本鎖 RNA 結合ドメイン 3 (RBD3) を介して核外輸送されているのに対し、Stau2⁵⁹ には RBD3 を介した経路に加え、N 末端に存在する核外移行シグナルを介した CRM1 による核外輸送経路が存在することを見出した。これは、Stau2 が核内で多様な RNA と結合し、RNA granule に輸送している可能性を示唆する重要な発見であり、RNA granule の形成機構および神経細胞における mRNA 輸送機構の解明につながる事が期待される。このような理由から、申請者は学位の授与に値すると考えられる。